

## **Retinopatia Diabética: um lapso de comunicação**

### **Diabetic Retinopathy: a communication gap**

Luís Pedro Franco Ribeiro

Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal

Endereço de correio electrónico: [lprmg89@gmail.com](mailto:lprmg89@gmail.com)

## RESUMO

As *gap junctions* são canais intercelulares, constituídos por hexâmeros de conexina (Cx), que permitem a passagem de íons e metabólitos entre células adjacentes. Um dos mecanismos envolvidos na regulação da comunicação intercelular por *gap junctions* (CIGJ) é a degradação de Cx, nomeadamente através de um processo mediado pela ubiquitina. No caso concreto da conexina 43 (Cx43), a ubiquitinação é catalisada pela Nedd4, uma ligase de ubiquitina (E3).

Apesar de já ter sido demonstrado que a hiperglicémia conduz a uma degradação da Cx43, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo continuam largamente desconhecidos.

Neste trabalho investigaram-se os efeitos da hiperglicémia em células do epitélio pigmentado da retina (EPR) nos níveis de Cx43, bem como na velocidade de degradação, na ubiquitinação e localização subcelular da conexina em estudo. Em seguida investigou-se o efeito da inibição da expressão de Nedd4 nas variáveis supracitadas. Por fim verificou-se que a diminuição de Cx43 provocada pela hiperglicémia tem repercussões funcionais na CIGJ.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a incubação de células do EPR com elevadas concentrações de glucose resulta na diminuição da quantidade total de Cx43, determinada por *Western blot*. A avaliação do tempo de vida da proteína mostra que a diminuição de Cx43 resulta de um aumento da sua degradação. Através de ensaios de imunoprecipitação demonstrou-se que os níveis de ubiquitinação da Cx43 aumentam em hiperglicémia. Resultados obtidos por microscopia confocal mostram que há uma redução da quantidade de Cx43 perto da membrana plasmática, assim como uma diminuição da CIGJ. No entanto, células depletadas de Nedd4, através de incubação com *siRNA* contra Nedd4, apresentam uma estabilização da Cx43 em hiperglicémia, quer em termos de quantidade total da proteína, quer no que respeita à sua localização na membrana plasmática.

Estes resultados sugerem que a ubiquitinação de Cx43 mediada por Nedd4 é um sinal para internalização e degradação de Cx43 em hiperglicémia, que poderá contribuir para as disfunções celulares observadas na retinopatia diabética.

Palavras-chave: Retinopatia diabética; Ubiquitina; Nedd4; Hiperglicémia; Conexina 43; Cx43; Comunicação Intercelular por Gap Junction; Gap Junction

## **ABSTRACT**

Gap junctions (GJ) are intercellular channels which allow ion and metabolite interchange between juxtaposed cells. These channels are formed by two hemichannels, each composed of six connexin subunits anchored in each adjacent cell. Gap junction intercellular communication (GJIC) can be regulated in many different ways. Connexin 43 (Cx43) degradation is one of the most important, and also perhaps securest, instrument of GJIC regulation. Nedd4-mediated ubiquitination of Cx43 acts as an internalization and degradation signal for Cx43. This mechanism leads do GJ degradation in many cell types, however the molecular machinery involved in this process remain elusive. The main purpose of this study is to evaluate the effect of Cx43 turnover in retinal pigmented epithelium (RPE) cells incubated in high glucose (HG) conditions as well as the mechanisms and molecular apparatus involved.

The data obtained shows a reduction in total levels of Cx43 in cells cultured on HG, concomitantly with a decrease in the amount of Cx43 localized at the plasma membrane. Moreover, levels of Cx43 ubiquitination are increased in HG, suggesting ubiquitin may act as a signal for degradation of Cx43. Also, Nedd4 depletion precludes Cx43 internalization and degradation in HG cultured cells, suggesting HG-induced degradation of Cx43 depends on Nedd4.

These results advocate that Nedd4-mediated Cx43 ubiquitination is a signaling pathway to Cx43 internalization and/or degradation in HG conditions, possibly contributing cellular dysfunction seen in diabetic retinopathy.

Key-words: Diabetic Retinopathy; Ubiquitin; Nedd4; Hyperglycemia; Connexin 43; Cx43; Gap Junction Intercellular Comunication; Gap Junction.

## INTRODUÇÃO

As *gap junctions* (GJ) são estruturas multiméricas, utilizadas pelas células para a difusão de iões, metabolitos e mensageiros secundários. As GJ são compostas por proteínas transmembranares, designadas de conexinas, acopladas de forma hexamérica[1], formando dois hemicanais ancorados a cada célula justaposta. Cada conexina compreende quatro domínios transmembranares, duas ansas extracelulares e três domínios citoplasmáticos[2].

O tempo de vida curto da conexina 43 (Cx43), entre 1,5 e 5 horas, sugere que a sua síntese, degradação e/ou internalização possa contribuir para a regulação da comunicação intercelular por GJ (CIGJ). [3-5].

A ligação da ubiquitina a proteínas membranares é um sinal para endocitose e degradação pelo proteossoma[6-8] e/ou do lisossoma[8[9]. A Nedd4, expressa em quase todos os tecidos humanos, foi descrita como uma das principais ligases da ubiquitina (E3) envolvida na ubiquitinação de proteínas da membrana [10], incluindo a Cx43[11]. A ubiquitinação de Cx43 (no motivo PY do seu terminal-C) na superfície da célula, após a ligação à Nedd4 (pelo motivo WW2), está associada a uma internalização e degradação das GJ, constituindo um meio de regulação da CIGJ[3, 10-12]. Por outro lado, a proteína endocítica, Eps15 (que se co-localiza com a Cx43 na célula[12]), interage com a Cx43 ubiquitinada, participando na internalização da proteína localizada na membrana plasmática[12].

A retinopatia diabética (RD) é uma doença neurovascular e a principal causa de cegueira na população activa em países desenvolvidos[13]. Actualmente, há algumas vias de sinalização intracelular propostas para explicar a toxicidade da glucose: glicação não enzimática, activação da proteína cinase C (PKC) e produção aumentada de espécies reactivas de oxigénio (ROS)[14], que afectam vários tipos de células da retina, incluindo o epitélio pigmentado da retina (EPR), endotélio, neurónios e foto-receptores. Foi também descrito que a hiperglicémia

conduz a uma diminuição dos níveis de Cx43 em células endoteliais da retina[7] podendo levar à apoptose[15] por vias de sinalização ainda pouco estudadas. Assim sendo, os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na internalização e degradação da Cx43 em células expostas a elevadas concentrações de glucose continuam por esclarecer. O principal objectivo deste estudo consiste na avaliação do papel da ubiquitinação na degradação da Cx43 em células do EPR expostas a condições de hiperglicémia.

Neste trabalho procurou estudar-se a influência de um meio com elevadas concentrações de glucose (AG) na velocidade de degradação da Cx43 e na ubiquitinação da Cx43. Foi também realizado um estudo de permeabilidade intercelular para comparar a CIGJ nos dois grupos (AG e baixa glucose). Em seguida estudou-se a influência da ausência de Nedd4 na quantidade e localização subcelular de Cx43.

## MATERIAL E MÉTODOS

### I. Material:

Anticorpos: o anticorpo policlonal anti-Cx43 de coelho foi adquirido à Zymed (CA, EUA), o anticorpo monoclonal anti-Cx43 de murganho foi obtido na Zymed (CA, EUA), o anticorpo monoclonal anti-Cx43 de murganho foi obtido na BD Transduction Laboratories (BD Biosciences, CA, EUA), os anticorpos policlonais anti-Nedd4 foram obtidos da Abcam (Cambridge, RU), os anticorpos P4D1 anti-ubiquitina foram obtidos da Covance (CA, EUA), os anticorpos Fk1 anti-ubiquitina foram obtidos da Biomol (Exeter, RU).

Ciclohexamida Sigma (EUA)

Lipofectamina 2000 Invitrogen (RU)

Amarelo de Luciferina/*Lucifer Yellow* Sigma (EUA)

### II. Culturas celulares

As células do epitélio pigmentado da retina (ARPE-19) foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% soro fetal de bovino e penicilina 100 U.I./mL e estreptomicina 100 µg/mL.. As células foram incubadas com 15 mM (baixa glucose) ou 40 mM glucose (alta glucose) durante 2 e 3 dias, numa incubadora a 37 °C, com 5 % de CO<sub>2</sub>.

As células utilizadas nos ensaios de imunocitoquímica foram cultivadas em lamelas de vidro. Para os ensaios de silenciamento, as células foram cultivadas em placas de cultura.

Os extractos celulares foram preparados após lavagem com solução tampão de fosfato (PBS), e a lise celular foi obtida usando tampão de lise (190 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 6 mM

EDTA, 1% Triton X-100, pH 8,3). As amostras foram sonicadas e centrifugadas a 10.000g durante 10 minutos. Os extractos foram congelados a -80°C.

### III. Silenciamento mediado por Ácido ribonucleico de interferência (siRNA)

SiRNA contra Nedd4 (s9416 ou 9417) e uma sequência controlo sem alvo foram obtidos da Ambion (*Silencer Select Pre-designed SiRNA*). As células foram cultivadas até atingirem 70-90% de confluência celular. O siRNA foi transfectado com Lipofectamina 2000 (Invitrogen, UK), de acordo com as instruções do fabricante, numa concentração final de 20 nM. O silenciamento foi conseguido através de duas transfecções separadas por 24 horas, tendo as experiências sido realizadas 24 horas após a segunda transfecção.

### IV. Inibição da síntese proteica com ciclohexamida (Cycloheximide Chase)

A síntese proteica foi inibida pela adição de ciclohexamida (10 µM) ao meio de cultura, durante 2 e 4 horas. O tempo de vida da Cx43 foi depois avaliado através da quantificação dos níveis de Cx43 por *Western blot*

### V. Imunoprecipitação e Western-blot

Os extractos foram lavados com PBS a 4°C e ressuspensos em tampão de lise (190 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8,3) suplementado com cocktail inibidor de proteases (Roche), 2 mM PMSF, 10 mM iodacetamida, tendo sido por fim incubados em gelo durante 10 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos, a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para imunoprecipitação.

Para o protocolo de imunoprecipitação, a proteína A foi incubada ou com anticorpos policlonais contra Cx43 (Zymed), ou com soro de coelho não imune, durante 1 hora a 4°C. Em seguida, procedeu-se à incubação com sobrenadantes durante 3 horas a 4°C. As amostras foram posteriormente centrifugadas e os sedimentos proteína A-sepharose lavados 3 vezes

com tampão de lavagem (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 6 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 8,3), sendo de seguida ressuspendidas em tampão de Laemmli (4 ml 1,5 M Tris-Cl pH 6,8, 10 ml glicerol, 5 ml  $\beta$ -mercaptoetanol, 2 g SDS (*sodium dodecyl sulfate / sodium lauryl sulfate*), 1 ml 1% azul de bromofenol) e desnaturadas a 37 °C durante 30 minutos.

Para o protocolo de *Western blot*, os extractos celulares foram preparados após lavagem com PBS, e a lise celular foi obtida usando tampão de lise e centrifugadas a 10.000g durante 10 minutos. Os extractos foram congelados a -80°C.

Os extractos celulares foram separados por electroforese em gel de 10% poliacrilamida em condições desnaturantes, na presença de SDS (SDS-PAGE). Para análise por imunodeteção, as proteínas foram transferidas do gel de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose. As membranas foram depois bloqueadas durante 1 hora com 5 % (p/v) de leite magro em *Tween* 20 0,1 % (que designaremos por PBST à temperatura ambiente) e incubadas durante 90 minutos à temperatura ambiente, ou durante a noite a 4 °C, com o anticorpo primário, diluído em 1% (p/v) de leite magro em PBST. As membranas foram depois lavadas, durante 60 minutos em 0.5 % (p/v) de leite magro em PBST e incubadas durante 30 minutos à temperatura ambiente, com o anticorpo secundário diluído em 1 % (p/v) de leite magro em PBST.

## VI. Imunofluorescência

As células foram cultivadas em lamelas lavadas com PBS e fixadas em paraformaldeído a 4% durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram novamente lavadas com PBS, permeabilizadas com 0,2% v/v Triton X-100 em PBS e bloqueadas com soro de cabra a 1% durante 20 minutos, antes da incubação com os anticorpos primários. A incubação com o anticorpo primário decorreu durante 1 hora à temperatura ambiente. As amostras foram lavadas três vezes com PBS antes da incubação com o anticorpo secundário (1 hora à

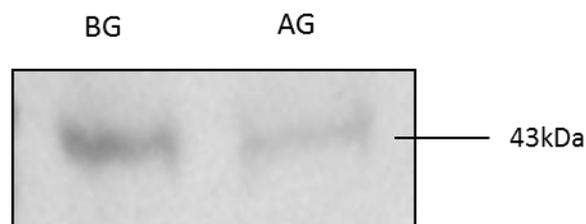
temperatura ambiente). As lamelas foram lavadas com PBS e seguiu-se a montagem das lamelas com o reagente *Glycergel* (Dako). Todas as soluções foram realizadas com albumina de soro bovino a 0,2% w/v e com azide de sódio (Sigma) a 0,02% em PBS. Nos grupos de controlo, os anticorpos primários foram omitidos. As imagens foram recolhidas com o microscópio confocal Zeiss LSM710.

#### VII. Ensaio de Permeabilidade com Amarelo de Luciferina (*Lucifer Yellow*)

Para este ensaio de permeabilidade ao contraste *lucifer yellow* foram utilizadas células cultivadas em lamelas de vidro. Resumidamente, retirou-se e guardou-se o meio de cultura. Em seguida as células foram lavadas 3 vezes com solução de Hank com 1% de albumina de soro bovino. Posteriormente, utilizou-se uma agulha de calibre 27G para introduzir um rasgo na monocamada de células, na presença de solução tampão de fosfato de Dulbecco, com 0,5% de rodamina-dextrano e 0,5% de *lucifer yellow*. Após 1 minuto, as células foram lavadas com a solução de lavagem supracitada e incubadas durante 8 minutos no meio de cultura que havia sido guardado inicialmente. Este tempo permite a passagem do corante a partir do rasgo para as células adjacentes. As células foram então lavadas e fixadas com paraformaldeído a 4% para captura de imagens através de microscópio de fluorescência com uma fonte de luz UV. A eficiência da CIGJ poderá ser comparada pela distância percorrida pelo corante *lucifer yellow*.

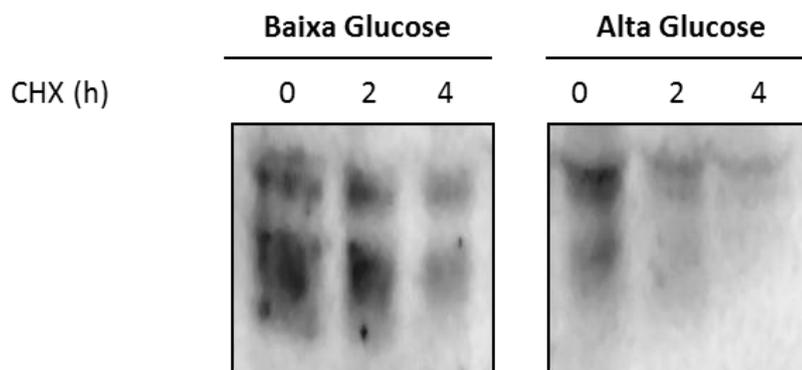
## RESULTADOS

Apesar de ter sido já demonstrado, em vários tipos de células, que a hiperglicémia resulta na diminuição da quantidade de Cx43, este efeito não foi ainda avaliado em células do EPR. Assim, numa primeira fase deste estudo fomos avaliar os níveis de Cx43 em células do EPR incubadas na presença de 15 (alta glucose) ou 40 mM (baixa glucose) de glucose, durante 3 dias. Os resultados obtidos, e presentes na fig. 1, demonstram que em células incubadas com 40 mM de glucose há um decréscimo significativo de Cx43, comparado com células incubadas com 15 mM.



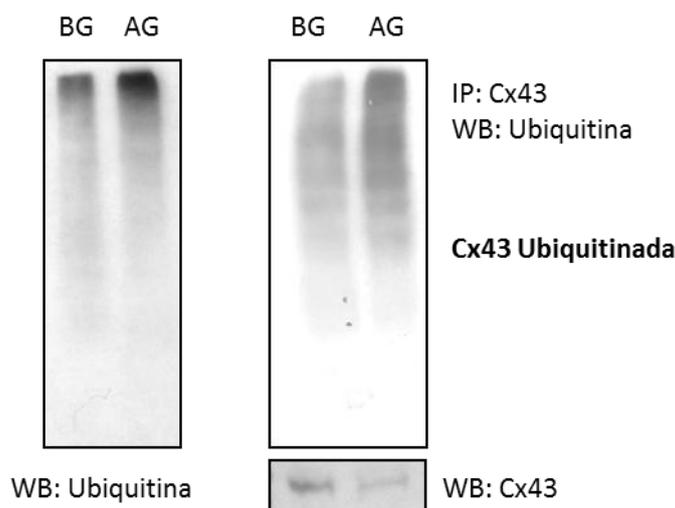
**Figura 1: Os níveis de Cx43 diminuem em células do EPR incubadas com altas concentrações de glucose.** A linha celular ARPE-19 foi cultivada em condições de baixa glucose (BG) e em condições de alta glucose (AG). Pela técnica de *Western blot*, descrita na secção de material e métodos, demonstramos a presença da proteína na linha ARPE-19, e que esta se encontra diminuída em condições de AG. BG: baixa glucose (15µM); AG: alta glucose (40µM); kDa: quilodalton

A diminuição de Cx43 em células incubadas com elevadas concentrações de glucose sugere que nestas condições há uma maior degradação dessa proteína. Para testar esta hipótese avaliámos o tempo de vida da Cx43 em células incubadas com 15 ou 40 mM de glucose, durante 3 dias, na presença do inibidor da síntese de proteica, a ciclohexamida, durante vários períodos de tempo. Os resultados obtidos demonstram que o desaparecimento de Cx43 ao longo do tempo é mais rápido em células ARPE-19 cultivadas em alta glucose (AG), em comparação com células incubadas em baixa glucose (BG), o que sugere fortemente que a hiperglicémia conduz a uma degradação mais rápida da proteína.



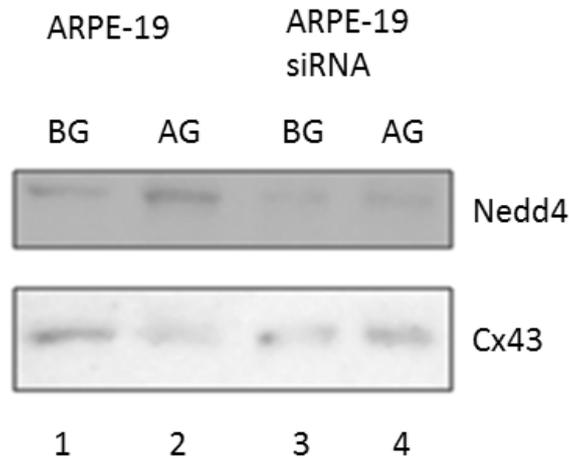
**Figura 2 – O tempo de vida da Cx43 diminui em células do EPR incubadas com altas concentrações de glucose.** A linha celular ARPE-19 foi cultivada em condições de baixa glucose e de alta glucose durante 3 dias, em simultâneo com um inibidor da síntese de proteína, a ciclohexamida (10 $\mu$ M). Pela técnica de *Western blot*, descrita na secção de material e métodos, foi possível observar a expressão de Cx43. CHX (h): tempo em horas de incubação com ciclohexamida.

Uma vez demonstrado que, em células do EPR, a AG resulta na degradação aumentada da Cx43, no passo seguinte deste estudo fomos avaliar se a ubiquitina seria o sinal que dirige a proteína para degradação, uma vez que foi já demonstrado noutras linhas celulares que a ubiquitinação constitui um sinal para internalização e degradação de Cx43 [12]. Para avaliar os níveis de ubiquitinação da Cx43, em células incubadas na presença de 15 e 40 mM de glucose, procedeu-se à imunoprecipitação de Cx43 seguida de *Western blot* com marcação para a ubiquitina. Os resultados obtidos e apresentados na fig. 3 demonstram que em situações de alta glucose há uma maior ligação da ubiquitina à Cx43. Este resultado sugere fortemente que a ubiquitinação poderá constituir um sinal de degradação da Cx43 em condições de hiperglicémia.



**Figura 3. Os níveis de ubiquitinação da Cx43 aumentam em células incubadas na presença de elevadas concentrações de glucose. A expressão de Cx43 está diminuída em condições de alta glucose na linha celular ARPE-19, embora esteja mais ligada à ubiquitina.** A linha celular ARPE-19 foi cultivada em condições de baixa glucose e de alta glucose durante 3 dias. Pela técnica de *Western blot*, descrita da secção material e métodos, detectou-se quantidade de proteínas ubiquitinadas no extracto total das células cultivadas. No imunoprecipitado para a Cx43, pela técnica de *Western blot* descrita acima, foi possível observar a ubiquitinação da Cx43. BG: baixa glucose (15 $\mu$ M); AG: alta glucose (40 $\mu$ M); IP: imunoprecipitação; Cx43: conexina 43; WB: *Western blot*

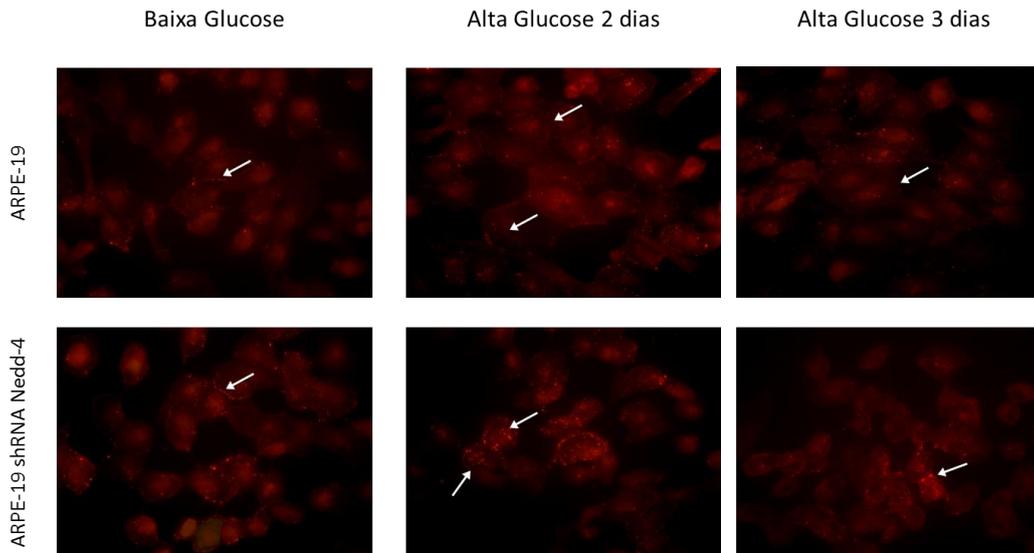
Tendo estabelecido que há um aumento da ubiquitinação da Cx43, fomos seguidamente avaliar se a Nedd4, enzima que regula a ubiquitinação de Cx43 em vários modelos celulares[10], seria a ligase de ubiquitina envolvida neste mecanismo. Para avaliar o papel da Nedd4 na degradação da Cx43, procedeu-se ao seu silenciamento por *siRNA*. As células em que se procedeu ao silenciamento da Nedd4 e as células controlo foram incubadas com meio contendo 15 e 40 mM de glucose. Os nossos resultados indicam que, na presença de Nedd4, células incubadas com AG apresentam uma redução dos níveis de Cx43 (comparar coluna 1 e coluna 2 da fig. 4). No entanto, na ausência de expressão Nedd4, a quantidade de Cx43 não varia quando comparamos as linhas incubadas em baixa glucose (BG) e AG. Estes resultados sugerem que a degradação de Cx43 em AG depende da presença de Nedd4 (fig. 4).



**Figura 4 – Nedd4 regula a expressão de Cx43 em condições de AG:** A linha celular ARPE-19 foi cultivada em condições de baixa glucose e de alta glucose durante 3 dias, tendo sido utilizada a técnica de *siRNA* para silenciar a expressão de Nedd4, já acima descrita. Os níveis totais de Cx43 (em baixo) e Nedd4 (em cima) foram avaliados por *Western blot*. BG: baixa glucose (15 $\mu$ M); AG: alta glucose (40 $\mu$ M); Cx43: conexina 43.

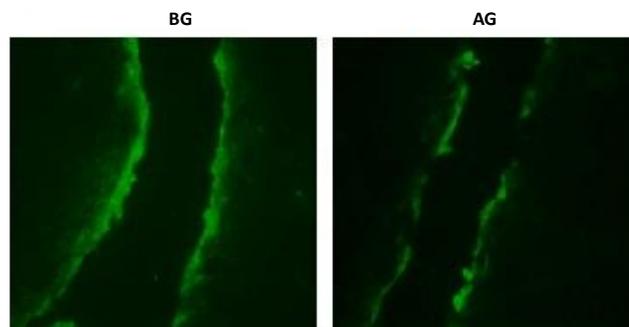
Embora os resultados anteriores demonstrem uma diminuição dos níveis totais de Cx43, é necessário avaliar o efeito de condições de AG na distribuição subcelular da proteína, nomeadamente a quantidade de proteína localizada na membrana plasmática, uma vez que é nesta localização que está a Cx43 que participa na CIGJ.

Pela técnica de imunocitoquímica observou-se que em condições de BG a Cx43 localiza-se maioritariamente na membrana plasmática (fig. 5), enquanto com AG ocorreu uma redistribuição da Cx43, com uma diminuição ao nível da membrana celular (fig. 5). Sabendo que Nedd4 regula a degradação da Cx43 (fig. 4), avaliámos, em seguida, o efeito do silenciamento da Nedd4 na localização subcelular da Cx43. Com o silenciamento de Nedd4, foi possível observar um aumento da Cx43 ao nível da membrana (fig. 5).



**Figura 5: O silenciamento de Nedd4 impede a endocitose de Cx43 da membrana.** A linha celular ARPE-19 foi cultivada em condições de baixa glicose e de alta glicose durante 2 e 3 dias, tendo sido utilizada a técnica de *siRNA* para silenciar a expressão de Nedd4, já acima descrita. A técnica de imunocitoquímica, já previamente descrita, foi utilizada para observar qual a localização da Cx43. *siRNA* Nedd4: células transfectadas com ácido ribonucleico de interferência contra Nedd4.

Uma vez demonstrado que a alta glicose resulta na diminuição dos níveis de Cx43 na membrana plasmática, avaliou-se depois o seu efeito em termos funcionais, ou seja, na CIGJ. Para isso realizámos ensaios com o corante amarelo luciferina na linha ARPE-19 e verificamos que em condições de AG ocorria uma diminuição da difusão do corante ao longo da monocamada de células, a partir do rasgo efectuado (fig. 6). Estes resultados demonstram que a alta glicose, através da redução da quantidade de Cx43 presente na membrana plasmática, leva a uma diminuição da CIGJ.



**Figura 6: Em alta glicose a comunicação intercelular está diminuída.** A linha celular ARPE-19 foi cultivada em condições de baixa glicose e de alta glicose durante 3 dias. A comunicação intercelular foi qualitativamente determinada pelo ensaio de amarelo de luciferina, já previamente descrito. BG: baixa glicose (15 $\mu$ M); AG: alta glicose (40 $\mu$ M)

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo ajudam a esclarecer o mecanismo através do qual altas concentrações de glucose levam a uma redução da comunicação intercelular. Este achado poderá estar na base de muitas das alterações fisiopatológicas associadas a muitas complicações da *diabetes mellitus*, entres as quais a RD. De acordo com o nosso modelo, a diminuição da CIGJ em AG resulta da degradação da Cx43, mediada pela ubiquitinação dependente de Nedd4.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para reforçar a etiologia multifactorial da doença neurovascular que é a RD. Esta poderá resultar, não só das já conhecidas alterações no endotélio dos vasos retinianos, mas também, de um lapso de comunicação por GJ entre células do EPR.

As células do EPR expressam Cx43, proteína cuja quantidade diminui em condições de hiperglicémia. Esta diminuição já tinha sido encontrada em células do endotélio retiniano[7], embora seja esta a primeira vez que tal se demonstra em células do EPR. Foi levantada a hipótese desta diminuição ser provocada pelo aumento da degradação por meio de uma via dependente de ubiquitina, uma vez que tal já acontece com outras proteínas, como o transportador de glucose GLUT1[16]. Esta hipótese foi testada através da confirmação da diminuição de Cx43 se dever a um aumento da velocidade de degradação e não a um défice de produção (embora para o provar fosse necessário realizar ensaios com PCR). O passo lógico seguinte foi verificar que a ubiquitinação da Cx43 está aumentada em células do EPR em condições de hiperglicémia. Como a ubiquitinação funciona como sinal de endocitose de Cx43[12], e a Nedd4 é a ligase de ubiquitina em condições de baixa glucose[10], quisemos testar se esta enzima teria o mesmo papel de promotor da via endocítica em condições de alta glucose. Constatou-se que numa linha incapaz de expressar Nedd4, a diminuição da quantidade de Cx43, comumente observada em condições de hiperglicémia, não acontece. Poder-se-á afirmar que, não só a Nedd4 é a ligase de ubiquitina responsável pela ubiquitinação de Cx43 em condições de hiperglicémia, como também a sua inibição poderá hipoteticamente reverter as alterações da CIGJ observadas em células cultivadas nesse tipo de meios. Em seguida seria importante averiguar o tipo de alterações na localização subcelular de Cx43 provocadas pela hiperglicémia (deslocalizando-a da membrana) e a sua possível reversão com a linha sujeita ao silenciamento de Nedd4. Mais uma vez se constatou a

possibilidade de reverter essas alterações, uma vez que nas linhas celulares incapazes de expressar Nedd4, não existe uma diferença notória na localização de Cx43 em células cultivadas em alta e baixa glucose.

Por fim demonstrámos que a CIGJ está diminuída, em condições de hiperglicémia, pela constatação de menor permeabilidade ao contraste utilizado, ficando por demonstrar se essas alterações poderão ser também revertidas em células que não expressam Nedd4.

De acordo com os dados obtidos neste trabalho e à luz do conhecimento actual, será possível dizer que a ubiquitinação promovida pela Nedd4 tem um papel preponderante na regulação da quantidade de Cx43, mais concretamente naquela localizada à membrana plasmática, em células do EPR quando submetidas a condições de altas concentrações de glucose *in vitro*. Tal como seria de esperar, em células cultivadas em condições de hiperglicémia onde foi abolida a síntese de Nedd4, este processo de sinalização pela ubiquitina está inibido, mantendo-se níveis de Cx43 (bem como a sua localização subcelular) semelhantes àquelas cultivadas em condições de baixa glucose.

Em jeito de conclusão, fica patente que a diminuição de Cx43, provocada por altas concentrações de glucose, tem sérias repercussões no funcionamento das GJ, diminuindo a CIGJ. Com este estudo poder-se-á ter aberto um caminho para novas abordagens no âmbito da investigação e tratamento da retinopatia diabética.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Exmo. Senhor Prof. Doutor Henrique Girão, meu orientador. Agradeço também a toda a equipa do Centro de Oftalmologia e Ciências da Visão, IBILI – Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra, Portugal. Por fim, agradeço à minha família e amigos.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Segretain, D. and M.M. Falk, Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochim Biophys Acta*, 2004. 1662(1-2): p. 3-21.
2. Sosinsky, G.E. and B.J. Nicholson, Structural organization of gap junction channels. *Biochim Biophys Acta*, 2005. 1711(2): p. 99-125.
3. Girao, H. and P. Pereira, Phosphorylation of connexin 43 acts as a stimuli for proteasome-dependent degradation of the protein in lens epithelial cells. *Mol Vis*, 2003. 9: p. 24-30.
4. Leithe, E. and E. Rivedal, Ubiquitination of gap junction proteins. *J Membr Biol*, 2007. 217(1-3): p. 43-51.
5. Laird, D.W., Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J*, 2006. 394(Pt 3): p. 527-43.
6. Beardslee, M.A., et al., Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res*, 2000. 87(8): p. 656-62.
7. Fernandes, R., H. Girao, and P. Pereira, High glucose down-regulates intercellular communication in retinal endothelial cells by enhancing degradation of connexin 43 by a proteasome-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 2004. 279(26): p. 27219-24.
8. Musil, L.S., et al., Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem*, 2000. 275(33): p. 25207-15.

9. Qin, H., et al., Lysosomal and proteasomal degradation play distinct roles in the life cycle of Cx43 in gap junctional intercellular communication-deficient and -competent breast tumor cells. *J Biol Chem*, 2003. 278(32): p. 30005-14.
10. Kjenseth, A., et al., Regulation of gap junction intercellular communication by the ubiquitin system. *Cell Signal*, 2010. 22(9): p. 1267-73.
11. Leykauf, K., et al., Ubiquitin protein ligase Nedd4 binds to connexin43 by a phosphorylation-modulated process. *J Cell Sci*, 2006. 119(Pt 17): p. 3634-42.
12. Girao, H., S. Catarino, and P. Pereira, Eps15 interacts with ubiquitinated Cx43 and mediates its internalization. *Exp Cell Res*, 2009. 315(20): p. 3587-97.
13. Heng, L.Z., et al., Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments. *Diabet Med*, 2012.
14. Lorenzi, M., Glucose toxicity in the vascular complications of diabetes: the cellular perspective. *Diabetes Metab Rev*, 1992. 8(2): p. 85-103.
15. Li, A.F. and S. Roy, High glucose-induced downregulation of connexin 43 expression promotes apoptosis in microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(3): p. 1400-7.
16. Fernandes, R., et al., Downregulation of retinal GLUT1 in diabetes by ubiquitinylation. *Mol Vis*, 2004. 10: p. 618-28.